

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/029266 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 7/62, (MATSUMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒663-8023 兵庫県 西宮市 大森町 1 1-3 3 Hyogo (JP).
C08G 63/90 // (C12P 7/62, C12R 1:01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012486 (74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番 2 0 号 中央ビル Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 30 日 (30.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ: 特願2002-285863 2002 年 9 月 30 日 (30.09.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小川 典子 (OGAWA, Noriko) [JP/JP]; 〒655-0872 兵庫県 神戸市 垂水区塩屋町 6 丁目 3 1-1 7 三青荘 Hyogo (JP). 宮本 憲二 (MIYAMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒223-0062 神奈川県 横浜市 港北区日吉本町 2 丁目 3-1 3 日管ハイム第 8 1 0 1 号 Kanagawa (JP). 小坂田 史雄 (OSAKADA, Fumio) [JP/JP]; 〒700-0063 岡山県 岡山市 大安寺東町 1 7-7 Okayama (JP). 松本 圭司

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PURIFYING 3-HYDROXYALKANOIC ACID COPOLYMER

(54) 発明の名称: 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の精製方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of purifying PHA, which is separated from PHA-containing microbial cells, at a high purity without causing a considerable decrease in its molecular weight. Namely, a method of purifying a 3-hydroxyalkanoic acid copolymer produced by a microorganism wherein a treatment with hydrogen peroxide is carried out while continuously or intermittently adding an alkali to an aqueous suspension containing the 3-hydroxyalkanoic acid copolymer separated from the microorganism to thereby control the pH value of the aqueous suspension.

(57) 要約: 本発明は、PHA 含有菌体から分離される PHA を、著しい分子量の低下を引き起こすことなく高純度で精製する方法を提供すること。微生物が産生した 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を精製する方法であって、微生物から分離した 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を含む水性懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加することによって、前記水性懸濁液の pH をコントロールしながら過酸化水素による処理を行うことからなる精製方法である。

明細書

3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の精製方法

技術分野

- 5 本発明は、微生物菌体によって産生された3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を精製する方法に関する。

背景技術

- ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸（以後PHAと称す）は多くの微生物種の細胞にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される熱可塑性ポリエステルであり、生分解性を有している。現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋立などにより処理されているが、これらの処理方法には地球の温暖化や埋立地の地盤弛緩等の問題点がある。そのためプラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限りがあり、実際には、プラスチック廃棄処理方法としては、焼却、埋立、リサイクルだけでは対応しきれず、自然界に放置されたままになるものも多いのが現状である。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害とならないPHAの様な生分解性プラスチックが注目されており、その実用化が切望されている。特に、微生物が菌体内で生成蓄積するPHAは、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響がほとんどないと予想されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体としての利用が可能と考えられる。

- 微生物が生成するPHAは、通常顆粒体を形成してその微生物の菌体内に蓄積されるため、PHAをプラスチックとして利用するためには、微生物の菌体内からPHAを分離して取り出すという工程が必要である。PHAを微生物菌体から分離精製する既知の方法として、大別すると、PHAが可溶である有機溶媒を用いて菌体からPHAを抽出する方法と、PHA以外の菌体構成成分を破碎もしくは可溶化させて除くことによりPHAを得る方法に分けられる。

有機溶媒による抽出を利用したPHAの分離精製方法では、PHAが可溶であ

る溶媒として、例えば1, 2-ジクロロエタンやクロロホルムといったハロゲン含有炭化水素を用いて抽出する方法がある（特開昭55-118394号公報、特開昭57-65193号公報参照）。しかし、これらハロゲン含有炭化水素は疎水性溶媒であるため、抽出前に、菌体を予め乾燥する等の、溶媒が菌体中のPHAと接触できるようにするための工程が必要となる。また、これらの方法においてはPHAを実用に値する濃度（たとえば5%）以上に溶解すると抽出液は極めて粘稠となり、溶解しなかった菌体残渣とPHAを含む溶媒層との分離が非常に困難である。更に、溶媒層からPHAを高い回収率で再沈殿させるためには溶媒層の4～5倍容のメタノールやヘキサン等のPHA不溶性溶媒が必要であるなど、再沈殿工程には大容量の容器が必要とされる。さらには、溶媒の使用量が膨大なため、溶媒の回収コストと損失溶媒のコストがかさむことになる。加えて近年、環境保護の観点から有機ハロゲン化合物の使用は制限される方向にあり、この方法での工業化は難しいのが現状である。

そこで、PHAが可溶でありかつ水と混ざり合う溶媒、例えばジオキサン（特開昭63-198991号公報参照）またはプロパンジオール（特開平02-69187号公報参照）またはテトラヒドロフラン（特開平07-79788号公報参照）の様な親水性溶媒を用いた抽出方法も提案されている。これらの方法は乾燥菌体や湿菌体からでもPHAを抽出することが可能な点と、菌体残渣と分離した溶媒層を冷却するだけでPHAの沈殿物が得られる点では好ましいと考えられる。しかし、これらの方法でもPHAの溶解した溶媒層の粘稠性の問題は解決されておらず、加えて抽出効率を上げるためには加熱が必要であり、水存在下で加熱するためにPHAの低分子化が避けられないことや、回収率が劣ることなどの欠点を有している。

一方、PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得る方法として、J. Gen. Microbiology, 1958年, 第19巻, p. 198-209には、菌体懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムで処理してPHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、プロセスとしては簡単ではあるが、大量の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があるためにコストが高くなる。また、PHAの著しい低分子化が引き起こ

されることが、得られたPHA内に無視できない量の塩素が残存することから実用には適さないと考えられる。

特公平04-61638号公報には、PHAを含有する微生物菌体懸濁液を100℃以上で熱処理することで菌体構造を破壊し、次いでタンパク質分解酵素処理と、リン脂質分解酵素処理あるいは過酸化水素処理とを組み合わせ、PHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、熱処理によってタンパク質が変性・不溶化するために、次のタンパク質分解酵素処理工程での負荷が増大すること、更には、処理工程が多く複雑であること、酵素は比較的高価であることからコストがかかる等の欠点を有している。

10 PHA含有微生物菌体を破碎する方法として、界面活性剤で処理したのち、菌体から放出された核酸を過酸化水素処理して分解し、PHAを分離する方法が提案されている（特表平08-502415号公報参照）が、界面活性剤を含む廃液は発泡が激しいことに加えて高いBOD負荷値を持つ。このような観点から界面活性剤の使用は工業的規模において望ましくない。

15 PHA含有微生物菌体を高圧ホモジナイザーで破碎してPHAを分離する方法が提案されている（特開平07-177894号公報、特開平07-31488号公報参照）。しかし、これらの方法は微生物菌体懸濁液を少なくとも3回、場合によっては加温して10回も高圧処理しなければ純度の高いPHAを得ることは出来ず、なおかつ得られるPHAの純度は65～89%程度と低いという欠点
20 がある。

また、PHA含有微生物懸濁液にアルカリを添加して加熱し、細胞を破碎してPHAを分離する方法が提案されている（特開平07-31487号公報参照）。しかし、得られるポリマーの純度は75.1～80.5%と低く、収率向上のためにアルカリ添加量を増やすとポリマーの低分子化が起こるなどの欠点があった。
25 さらに、アルカリ添加後に物理的破碎を行う方法もいくつか提案されているが（特開平07-31489号公報、Bioseparation, 1991年, 第2巻, 第95-105項参照）、アルカリ処理だけでは菌体構成成分は少量しか菌体外に出ておらず、続く高圧破碎処理後でも菌体構成成分がPHA画分に残存しており効率的でないこと、従って微生物菌体懸濁液を少なくとも5回高圧処理

しなければ純度の高いPHAを得ることは出来ず、なおかつ得られるPHAの純度は77~85%程度と低いという欠点がある。加えて、アルカリを添加する方法においては、一般に、微生物菌体から流出する菌体成分、特に核酸が、菌体懸濁液の粘度を上昇させ、その後の処理が困難になるという問題があった。

- 5 また、PHA含有微生物懸濁液をpH2未満の酸性に調整し50℃以上でPHAを分離する方法が提案されている（特開平11-266891号公報参照）。しかし、この方法はpH2未満のような強酸性で処理を行うために工業的規模では望ましくないこと、純度向上のためには酸処理の後にアルカリ性に調整する必要があり大量の塩が発生すること、また、得られるPHAの分子量が247万から100万程度にまで低下するなどの欠点を有している。

特開平07-177894号公報では菌体を高圧破碎処理したあと酸素系漂白剤で処理することによりポリ-3-ヒドロキシブチレート（以後PHB）を分離精製する方法を提案している。PHBのスラリーを各種酸素系漂白剤で処理する方法を提示しているが、漂白処理時のpHについては記載されていない。

15

発明の要約

- 本発明の目的は、上記現状に鑑み、微生物菌体によって產生された3-ヒドロキシアルカン酸共重合体から少ない工程で3-ヒドロキシアルカン酸共重合体以外の菌体構成成分を効率よく取り除き、深刻な分子量の低下を引き起こすことなく、高純度で熔融時の黄変や異臭のない3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を高収率で得ることのできる精製方法を提供することにある。

- 本発明者らは、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体が、3-ヒドロキシアルカン酸単独重合体の場合と比較して、過酸化水素処理に伴う分子量低下が顕著であるという課題を見出し、この課題を解決するため鋭意検討した。その結果、過酸化水素処理を行う際に、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を含む水性懸濁液のpHをアルカリでコントロールすることによって深刻な分子量低下を防止することができることを見出した。

- すなわち本発明は、微生物が產生した3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を精製する方法であって、微生物から分離した3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を

含む水性懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加することによって、上記水性懸濁液のpHをコントロールしながら過酸化水素による処理を行うことからなる精製方法に関する。

以下、本発明を詳述する。

5

図面の簡単な説明

図1は、本発明の精製方法を実施するための装置の一例の概略図を示す。

符号の説明

- 10 1 攪拌槽
- 2 攪拌装置
- 3 pH検知制御装置
- 4 ポンプ
- 5 管路
- 15 6 アルカリ貯留槽
- 7 pH計

発明の詳細な開示

- 本発明における微生物は、細胞内に3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を蓄積している微生物であれば特に限定されない。例えばアルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、ラルストニア属 (*Ralstonia*)、シュウドモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*) の菌等が挙げられる。特に、アルカリゲネス
- 20 ・リポリティカ (*A. lipolytica*)、アルカリゲネス・ラトゥス (*A. latus*)、アエロモナス・キャビエ (*A. caviae*)、アエロモナス・
 - 25 ハイドロフィラ (*A. hydrophila*)、ラルストニア・ユートロファ (*R. eutropha*) 等の菌株、更には、アエロモナス・キャビエ由来の3-ヒドロキシアルカン酸共重合体合成酵素群の遺伝子を導入した菌株、特にラルス

トニア・ユートロファ (*R. eutropha*) (旧名 *Alcaligenes eutrophus* AC32) (ブダペスト条約に基づく国際寄託、国際寄託当局：独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6)、寄託日1997年8月7日、寄託番号 FERM BP-6038、原寄託 FERM P-15786 より移管) (J. Bacteriol., 179, 4821-4830頁 (1997)) 等がより好ましい。これら微生物を適切な条件で培養して菌体内に3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を蓄積させた微生物菌体が用いられる。その培養方法については特に限定されないが、例えば特開平05-93049号等に挙げられる方法が用いられる。

本発明における3-ヒドロキシアルカン酸共重合体とは、3-ヒドロキシアルカン酸から構成される共重合体の総称である。3-ヒドロキシアルカン酸成分としては特に限定されないが、具体的には、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) と他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体、または、D-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) を含む3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体などが挙げられる。さらに、3-ヒドロキシプロピオネート、3-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシヘキサノエート、3-ヒドロキシヘプタノエート及び3-ヒドロキシオクタノエートからなる群より選択される2種以上のモノマーから構成される共重合体なども挙げられる。なかでもモノマー成分として3HHを含む共重合体、例えば、3HBと3HHとの2成分共重合体 (PHBH) (*Macromolecules*, 28, 4822-4828 (1995))、または、3HBとD-3-ヒドロキシバレレート (3HV) と3HHとの3成分共重合体 (PHBVH) (特許第277757号, 特開平08-289797号) が、得られるポリエステルの物性の面からより好ましい。ここで3HBと3HHの2成分共重合体PHBHを構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、3HHユニットを1~99モル%といった組成比のものが好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体PHBVHを構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニットの含量は1~95モル%、3

HVユニットの含量は1～96モル%、3HHユニットの含量は1～30モル%といった範囲のものが好適である。

本発明における「微生物から分離した3-ヒドロキシアルカン酸共重合体」とは、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を含む微生物菌体を破碎することによって、微生物から遊離した3-ヒドロキシアルカン酸共重合体のことをいう。
5 微生物菌体の破碎方法としては特に限定されないが、従来公知の物理的破碎や、アルカリ添加による破碎等が挙げられる。

本発明における「微生物から分離した3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を含む水性懸濁液」とは、微生物から分離した3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を水に懸濁させたものであれば特に限定されない。また、悪影響がない範囲で有機溶剤が共存しても差し支えない。通常、当該懸濁液には、微生物菌体の破碎によって生じた菌体構成物質等が混入している。
10

上記水性懸濁液は、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体含有菌体の懸濁液を攪拌しつつ、物理的破碎と同時にアルカリを添加することによって3-ヒドロキシアルカン酸共重合体以外の菌体構成物質の全てまたは一部を可溶化して3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を分離し、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を水に懸濁させたものであることが好ましい。
15

本発明における「3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を含む水性懸濁液」の3-ヒドロキシアルカン酸共重合体濃度は、精製を効率よく行うという観点から、500g/L以下が好ましく、300g/L以下がより好ましい。
20

本発明においては、過酸化水素による上記水性懸濁液の処理と並行して、上記水性懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加することによって、上記水性懸濁液のpHをコントロールする。これによって、過酸化水素によるタンパク質（懸濁液に残存する菌体構成物質）の分解を行うとともに、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の分子量の深刻な低下を防止することができる。
25

本発明で使用するアルカリとしては、pHを特定の範囲に調整できるものであれば特に限定されるものではない。具体的には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウムなどを含めたアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水酸化物；炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属の炭

酸塩；酢酸ナトリウム、酢酸カリウムなどの有機酸のアルカリ金属塩；ほう砂等のアルカリ金属のホウ酸塩；リン酸3ナトリウム、リン酸水素2ナトリウム、リン酸3カリウム、リン酸水素2カリウムなどのアルカリ金属のリン酸塩；あるいはアンモニア水などが挙げられる。この中でも、工業生産に適し、また価格の点
5 で、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムなどが好ましい。

本発明において、アルカリの添加によってコントロールするpHの範囲は特に限定されないが、共重合体の分子量低下防止という観点から、pH7以上が好ましく、pH8以上がより好ましい。また上限はpH13以下が好ましく、pH12以下がより好ましい。特に、pH8からpH11の間で調整されることが好ま
10 しい。

コントロールするpHの上下幅としては設定値のそれぞれ1以内が好ましく、さらに好ましくは上下それぞれ0.5以内である。

本発明においては、アルカリの添加速度は特に限定されず、上記水性懸濁液のpHの推移を計測しながら、上記pHを所望の範囲にコントロールできるような
15 速度でアルカリを添加することが好ましい。

一般に、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を過酸化水素で処理すると、精製が進むにつれて、上記水性懸濁液のpHが徐々に下がっていく現象が見られる。本発明は、この現象を抑止するために、アルカリを連続的又は断続的に添加して上記水性懸濁液のpHを一定範囲内にコントロールするものである。pH14を
20 越えるような過剰なアルカリを添加すると、過酸化水素の分解が起こり精製の効率が下がるだけでなく、かえって3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の分子量の低下を招きやすい。また、アルカリの添加量が不足すれば、過酸化水素の活性が下がり十分な精製効果が得られず、また、酸性側に傾くと、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の分子量も大きく低下する傾向がある。適正な量のアルカリを
25 連続的又は断続的に添加してpHをコントロールすることによってはじめて、精製効率の向上と分子量低下の抑止という2つの目的を同時に達成することができる。

本発明において、過酸化水素の添加量は特に制限されないが、水性懸濁液中の濃度として10重量%以下が好ましく、5重量%以下がより好ましく、1重量%

以下がさらに好ましい。また適切な精製効果を得るためには、0.01重量%以上が好ましく、0.05重量%以上がより好ましく、0.1重量%以上がさらに好ましい。

特に本発明の場合、アルカリの添加による水性懸濁液のpHのコントロールによって、過酸化水素の添加量を低減しても優れた精製効果を得ることが可能となる。過酸化水素の添加量の低減は、精製工程のコストダウンや、排水処理負担の削減を可能にするため非常に好ましい。すなわち本発明においては、例えば、1重量%以下、さらには0.5重量%未満であっても優れた精製効果を得ることができる。アルカリの添加による水性懸濁液のpHのコントロールを行わず過酸化水素の処理のみを行った場合、このような低濃度では十分な精製効果を達成することができない。

本発明において、過酸化水素による処理は、室温以上の温度から水性懸濁液の沸点までの範囲で行うのが好ましい。短期間でより精製の効果を高めるために、好ましくは50℃以上、より好ましくは70℃以上で処理を行う。また、通常10分から10時間、好ましくは30分から5時間、さらに好ましくは1時間から3時間処理を行う。

過酸化水素処理を行った後、遠心分離を行って得られた沈殿物を水や有機溶媒、好ましくは親水性溶媒、具体的にはメタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフランなどの溶媒で洗浄し、乾燥させることによって、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を単離することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

25

(重合体の純度の測定方法)

重合体の水性懸濁液を遠心分離(2400rpm、15min)して上清を除去し、メタノール(ただし実施例4と比較例3の場合のみエタノールを使用)で2回洗浄した後、加熱・減圧下で乾燥して重合体の粉体を得た。重合体の粉体1

0 mg を、クロロホルム 1 ml に溶解したのち、メタノール 0.85 ml と濃硫酸 0.15 ml を加えて 100℃ で 140 分間処理した。これを冷却後、硫酸アンモニア飽和水溶液 0.5 ml を加えて激しく攪拌して静置し、下層部をキャピラリーガスクロマトグラフィーにて分析して、重合体の純度を求めた。

5

(重合体の分子量の測定方法)

重合体の分子量は、菌体より分離して得られた沈殿物 10 mg を、クロロホルム 1 ml に溶解したのち、不溶物を濾過により除いた。この溶液を Shodex K805L (300×8 mm、2 本連結) を装着した SHIMADZU 社製 GPC システムを用いクロロホルムを移動相として分析した。

10

(重合体の溶融時の YI 値の測定方法)

重合体の水性懸濁液を遠心分離 (2400 rpm、15 min) して上清を除去し、メタノール (ただし実施例 4 と比較例 3 の場合のみエタノールを使用) で 2 回洗浄した後、加熱・減圧下で乾燥して各サンプルを得た。PHBH サンプルは 170℃、PHB サンプルは 190℃ に熱したアルミブロックで 10 分間溶融させてペレットとし、日本電色工業 (株) 製分光式色彩計 SE-2000 で測定を行い、黄色度指数 (YI 値) を求めた。

15

20 (重合体中の残留窒素量の測定方法)

重合体の水性懸濁液を遠心分離 (2400 rpm、15 min) して上清を除去し、メタノールで 2 回洗浄した後、加熱・減圧下で乾燥して各サンプルを得た。各サンプルに関しダイヤインスツルメンツ社製の微量窒素分析装置 TN-10 を用いて測定した窒素濃度に 6.38 をかけてタンパク質換算を行った値で表示した。

25

(微生物から分離した PHBH を含む水性懸濁液の調製)

PHBH の懸濁液は、アエロモナス・キャピエ由来の 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体合成酵素群遺伝子を導入したラルストニア・ユウトロファ (旧名アル

カリゲネス・ユウトロファス AC32（上述の寄託番号FERM BP-6038）をJ. Bacteriol., 179, 4821-4830頁（1997）に記載の方法で培養し、PHBHを約67wt%含有した菌体を得た。遠心（5000rpm、10min）によって培養液から分離したペースト状の菌体
5 に水を加えて75g乾燥菌体/Lの水性懸濁液とし、アルカリとして水酸化ナトリウム水溶液を添加してpH11.7に保ちながら攪拌と物理的破碎とを行うことでPHBH以外の菌体構成物質を可溶化し、遠心分離（3000rpm、10min）を行って沈殿物を得た。沈殿物はさらに水洗を行い、平均分子量約70万、3HHモル分率5%、純度91%のPHBHを分離した。得られたPHBH
10 を75g/Lの水性懸濁液として、以下の実施例1～2及び比較例1～2で使用した。

図1は本発明の3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の精製方法を実施するための装置の一例の概略図である。もちろん本発明はこの装置例に限定されるものではない。

15

（実施例1）

PHBHの水性懸濁液50mlを、pH電極を装着した100ml攪拌槽に入れて70℃に保温した。pH電極は丸菱バイオエンジン社製ラボコントローラーMDL-6C型に接続し、pHが設定値以下になるとペリスタポンプが作動して
20 水酸化ナトリウム水溶液が設定値に達するまで該懸濁液内に入るように設定した。ラボコントローラーのpHを10に設定し、該懸濁液に30%過酸化水素水を過酸化水素濃度がポリマー重量に対して5重量%（懸濁液重量に対して0.375重量%）となるように添加して1時間攪拌を行った。次いでこの懸濁液を遠心分離によって2回水洗し、さらにメタノールで2回洗浄を行ったあと、乾燥して粉
25 体を得た。

同様にラボコントローラーのpHを7および8に設定して上記処理を行った。これらの結果を表1に示す。

表 1

	p H	純度 (%)	分子量	Y I 値	残留窒素量 (%)
	処理前	9 1	7 0 万	4 0 . 9	1 . 2 1
	7	9 7	7 0 万	2 8 . 2	
	8	> 9 9	7 0 万	2 8 . 3	
5	1 0	> 9 9	7 0 万	1 8 . 2	0 . 5 9

この結果から、過酸化水素処理時にアルカリを添加してp Hをコントロールすると、共重合体の純度が向上し残留窒素量が減少するとともに、共重合体の分子量は変化せず、さらには共重合体の溶融時の黄変が抑えられることが分かった。

10

(実施例 2)

実施例 1 と同様な方法で、ラボコントローラーのp Hを1 0に設定して、5 0℃で3 時間攪拌を行った。次いでこの懸濁液を遠心分離によって2 回水洗し、さらにメタノールで2 回洗浄を行ったあと、乾燥して粉体を得た。

15 この結果を表 2 に示す。

表 2

サンプル	純度 (%)	分子量	Y I 値
過酸化水素処理前	9 1	7 0 万	4 0 . 9
過酸化水素処理後	9 8	7 0 万	3 0 . 2

20

この結果から、アルカリを添加してp Hをコントロールしながら過酸化水素処理を行うと、共重合体の純度が向上するとともに、共重合体の分子量は変化せず、さらには共重合体の溶融時の黄変が抑えられることが分かった。

25

(実施例 3)

上記と同様な処理を行って得られた分子量1 4 8 万、3 H Hモル分率7 %、純度9 9 %のP H B H 1 1 0 g を水1 0 0 0 m l に懸濁させた懸濁液を作成し、p H電極とシルバーソンミキサーを装着した2 0 0 0 m l 攪拌槽に入れて7 0℃に

- 保温した。pH電極は丸菱バイオエンジン社製ラボコントローラーMDL-6C型に接続し、pHが設定値以下になるとペリスタポンプが作動して水酸化ナトリウム水溶液が設定pH10に達するまで該懸濁液内に入るように設定した。シルパーソンミキサーの回転数を5000回転に設定し、該懸濁液に30%過酸化水素水を過酸化水素濃度がポリマー重量に対して5重量%（懸濁液重量に対して0.375重量%）となるように添加して50分間攪拌を行った。次いでこの懸濁液を遠心分離によって3回水洗し、さらにメタノールで2回洗浄を行ったあと、乾燥して粉体を得た。結果を表3に示す。

10 表3

サンプル	純度(%)	分子量	YI値
過酸化水素処理前	99	148万	17.7
過酸化水素処理後	99	144万	11.3

- 15 この結果から、アルカリを添加してpHをコントロールしながら過酸化水素処理を行うと、共重合体の分子量は変化せず、共重合体の溶融時の黄変が抑えられることが分かった。

(比較例1)

- 20 実施例1で用いたものと同じPHBHの水性懸濁液（pH7.19）（処理1）50mlと、これに水酸化ナトリウムを添加してpH9.16とした懸濁液（処理2）50mlを、それぞれ、100ml攪拌槽にいて70℃に保温した。該懸濁液に30%過酸化水素水を過酸化水素濃度がポリマー重量に対して5重量%（懸濁液重量に対して0.375重量%）となるように添加し、pHの調整を行わずに3時間攪拌した。次いでこの懸濁液を遠心分離によって2回水洗し、さらにメタノールで2回洗浄を行ったあと、乾燥して粉体を得た。この結果を表4に示す。

表 4

5	サンプル	始発 pH	終了 pH	純度 (%)	分子量	Y I 値
	過酸化水素処理前	—	—	91	70万	40.9
	処理 1	7.19	4.60	>99	62万	31.7
	処理 2	9.16	5.32	>99	58万	30.9

この結果から、pHの調整をせずに過酸化水素の処理を行うと、共重合体の分子量は処理前の分子量の90%未満にまで低下することが分かった。

10 (比較例 2)

実施例 1 で用いた PHBH の懸濁液 50 ml の pH を希塩酸を用いて pH 5 に調整し、実施例 1 と同様に pH 電極を装着した 100 ml の攪拌槽に入れて 70℃ に保温した。ラボコントローラーの pH を 5 に設定して、30% 過酸化水素水を過酸化水素濃度がポリマー重量に対して 5 重量% (懸濁液重量に対して 0.375 重量%) となるように添加し、1 時間攪拌を行った。次いでこの懸濁液を遠心分離によって 2 回水洗し、さらにメタノールで 2 回洗浄を行ったあと、乾燥して粉体を得た。結果を表 5 に示す。

表 5

20	サンプル	純度 (%)	分子量	Y I 値
	過酸化水素処理前	91	70万	40.9
	過酸化水素処理後	99	45万	29.1

以上の結果から、酸によって pH をコントロールしながら共重合体の過酸化水素処理を行うと、共重合体の純度は向上し、溶融時の黄変は抑えられたものの、共重合体の分子量が大幅に低下することが判明した。

(実施例 4)

上記と同様な処理を行って得られた分子量 80 万、3HH モル分率 5%、純度 >99% の PHBH の懸濁液 50 ml に対して、実施例 1 と同様の処理を行った。

ただしラボコントローラーはpH8に設定した。この結果を表6に示す。

(比較例3)

過酸化水素を添加しないこと以外は、実施例4と同様の処理を行った。この結果を表6に示す。

表6

	サンプル	純度(%)	分子量	YI値
	処理前	>99	80万	15.9
10	実施例4 (アルカリ+過酸化水素処理)	>99	80万	8.3
	比較例3 (アルカリ加熱処理のみ)	>99	63万	14.1

表6の結果から、アルカリを添加してpHをコントロールしながら過酸化水素処理を行うことで、共重合体の分子量の低下を防止し、共重合体の熔融時の黄変を抑えられるが、過酸化処理を行わずにアルカリ添加によるpHコントロールのみを行った場合は、分子量は低下し、熔融時の黄変もほとんど抑制できないことがわかった。

20 (参考例1)

ポリ-3-ヒドロキシブチレート [アルドリッチ社製、純度95%、分子量65万] の10%水性懸濁液に30%過酸化水素水を過酸化水素濃度がポリマー重量に対して5重量% (懸濁液重量に対して0.375重量%) となるように添加した。この水性懸濁液のpHを調整せずに、70℃で3時間加熱攪拌した。次いでこの懸濁液を遠心分離によって2回水洗し、さらにメタノールで2回洗浄を行ったあと、乾燥して粉体を得た。この粉体の結果を表7に示す。

表 7

サンプル	始発pH	終了pH	純度(%)	分子量	YI値
過酸化水素処理前	—	—	95	65万	26.5
過酸化水素処理後	6.90	5.4	97	65万	15.2

- 5 単独重合体に対してpHの調整をせずに過酸化水素処理を行っても、分子量の低下はみられず、熔融時の黄変も抑えられることが分かった。

(参考例2)

- PHB [純度95%、分子量65万]の10%水性懸濁液のpHを希塩酸でpH5にし、70℃で保温した。該懸濁液に30%過酸化水素水を過酸化水素濃度がポリマー重量に対して5重量% (懸濁液重量に対して0.375重量%) となるように添加して、3時間攪拌を行った。次いでこの懸濁液を遠心分離によって2回水洗し、さらにメタノールで2回洗浄を行ったあと乾燥して粉体のPHBを得た。この粉体の分子量は65万であり、過酸化水素処理前の分子量を保持していた。PHBは酸を添加して過酸化水素処理を行っても分子量を保持していることがわかった。

- 参考例1及び2の結果から、単独重合体の場合には過酸化水素処理の際にアルカリでpHをコントロールしなくとも分子量が低下しないことがわかった。すなわち、過酸化水素処理の際に分子量が低下するのは共重合体に特異な現象であり、本発明の精製方法によればこの共重合体の分子量低下を防止することができる。

産業上の利用可能性

- 本発明の3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の精製方法によれば、きわめて簡便な方法によって、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の過酸化水素処理時の深刻な分子量の低下を防止し、かつ、高純度で熔融時の黄変や異臭のない3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を高収率で得ることができる。

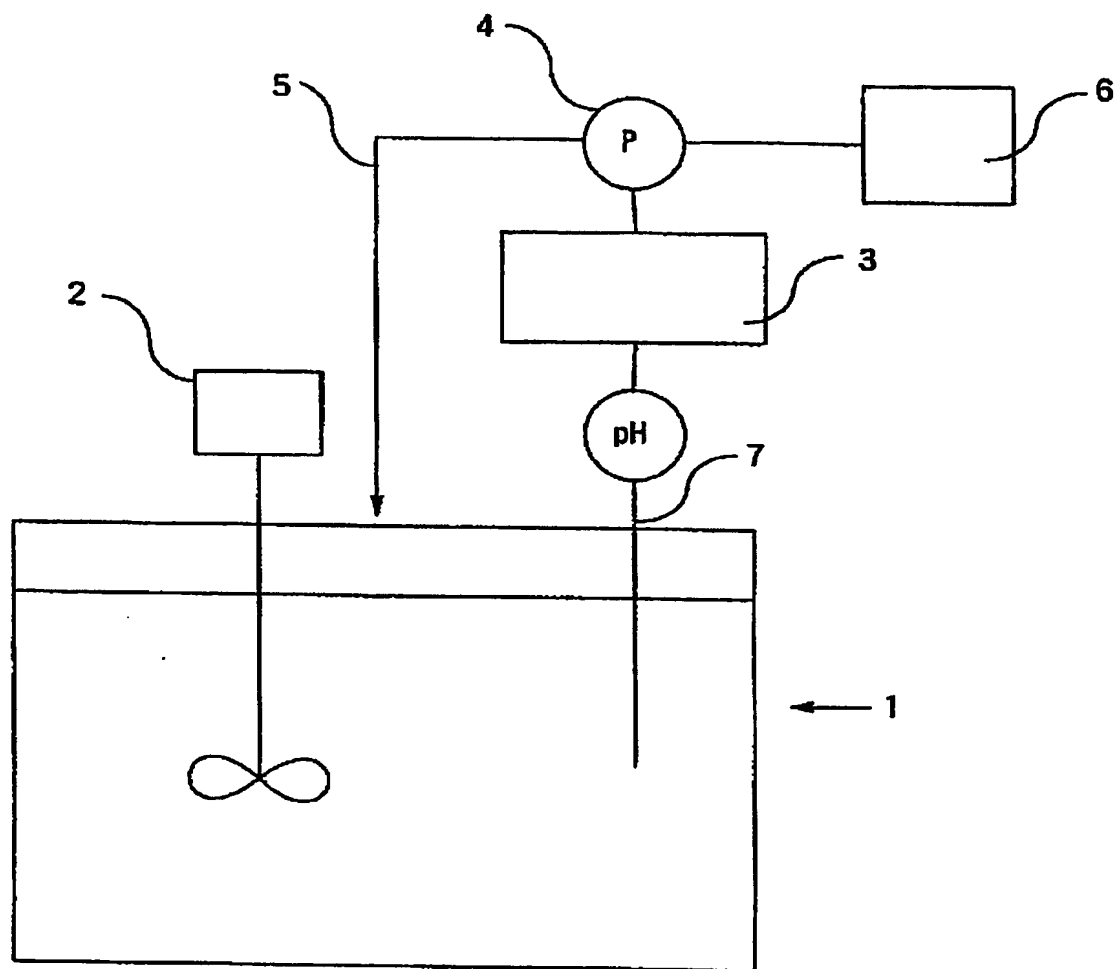
この方法により得られる極めて高純度な3-ヒドロキシアルカン酸共重合体は幅広い用途に用いることができ、工業的に非常に有用である。

請求の範囲

1. 微生物が産生した 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を精製する方法であって、
- 5 微生物から分離した 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を含む水性懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加することによって、前記水性懸濁液の pH をコントロールしながら過酸化水素による処理を行うことを特徴とする精製方法。
2. 水性懸濁液の pH を 7～13 の間にコントロールすることを特徴とする請求の範囲第 1 項記載の精製方法。
- 10 3. 水性懸濁液中の過酸化水素の濃度が 0.01 重量%～1 重量%の範囲であることを特徴とする請求の範囲第 1 又は 2 項記載の精製方法。
- 15 4. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体が、D-3-ヒドロキシヘキサノエートと他の D-3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体である請求の範囲第 1～3 項のいずれかに記載の精製方法。
5. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体が、3-ヒドロキシプロピオネート、
- 20 3-ヒドロキシブチレート、3-ヒドロキシバレレート、3-ヒドロキシヘキサノエート、3-ヒドロキシヘプタノエート及び 3-ヒドロキシオクタノエートからなる群より選択される 2 種以上のモノマーから構成される共重合体である請求の範囲第 1～3 項のいずれかに記載の精製方法。
- 25 6. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体が、D-3-ヒドロキシヘキサノエートと D-3-ヒドロキシブチレートとの 2 成分共重合体、または、D-3-ヒドロキシヘキサノエートと D-3-ヒドロキシブチレートと D-3-ヒドロキシバレレートとの 3 成分共重合体である請求の範囲第 1～3 項のいずれかに記載の精製方法。

7. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を産生する微生物が、アエロモナス属に属する微生物である請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の精製方法。
- 5 8. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を産生する微生物が、アエロモナス・キャピエまたはアエロモナス・ハイドロフィラである請求の範囲第7項記載の精製方法。
9. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を産生する微生物が、アエロモナス・
- 10 キャピエ由来の3-ヒドロキシアルカン酸共重合体合成酵素群遺伝子を導入された菌株である請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の精製方法。
10. 3-ヒドロキシアルカン酸共重合体の水性懸濁液が、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体含有菌体の懸濁液を攪拌しつつ、物理的破碎と同時にアルカリ
- 15 を添加することによって3-ヒドロキシアルカン酸共重合体以外の菌体構成物質の全てまたは一部を可溶化して3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を分離し、3-ヒドロキシアルカン酸共重合体を水に懸濁させたものである請求の範囲第1～9項のいずれかに記載の精製方法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P7/62, C08G63/90 // (C12P7/62, C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P1/00-41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/06178 A1 (ZENECA LTD.), 29 February, 1996 (29.02.96), Examples & JP 10-504459 A & US 5952460 A	1-10
A	WO 94/10289 A1 (ZENECA LTD.), 11 May, 1994 (11.05.94), & JP 08-502415 A & US 5627276 A	1-10
A	US 5627276 A (Kaneka Corp.), 08 March, 1994 (08.03.94), & JP 05-093049 A & EP 0533144 A2	1-10
A	US 4358583 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC.), 09 November, 1982 (09.11.82), & JP 57-065193 A & EP 0046017 A2	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
01 December, 2003 (01.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12486

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-340095 A (Canon Inc.), 11 December, 2001 (11.12.01), (Family: none)	1-10
A	JP 2001-046094 A (Kaneka Corp.), 20 February, 2001 (20.02.01), (Family: none)	1-10
A	JP 07-079787 A (Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 28 March, 1995 (28.03.95), (Family: none)	1-10
A	JP 07-031487 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 03 February, 1995 (03.02.95), (Family: none)	1-10
A	JP 07-031488 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 03 February, 1995 (03.02.95), (Family: none)	1-10
P,A	JP 2002-306190 A (Canon Inc.), 22 October, 2002 (22.10.02), (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P7/62, C08G63/90 // (C12P7/62, C12R1:01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P1/00-41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/06178 A1 (ZENECA LIMITED) 1996.02.29, 実施例 & JP 10-504459 A & US 5952460 A	1-10
A	WO 94/10289 A1 (ZENECA LIMITED) 1994.05.11 & JP 08-502415 A & US 5627276 A	1-10
A	US 5627276 A (鐘淵化学工業株式会社) 1994.03.08 & JP 05-093049 A & EP 0533144 A2	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司



4B

9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 4358583 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 1982. 11. 09 & JP 57-065193 A & EP 0046017 A2	1-10
A	JP 2001-340095 A (キヤノン株式会社) 2001. 12. 11 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2001-046094 A (鐘淵化学工業株式会社) 2001. 02. 20 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 07-079787 A (電気化学工業株式会社) 1995. 03. 28 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 07-031487 A (旭化成工業株式会社) 1995. 02. 03 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 07-031488 A (旭化成工業株式会社) 1995. 02. 03 (ファミリーなし)	1-10
PA	JP 2002-306190 A (キヤノン株式会社) 2002. 10. 22 (ファミリーなし)	1-10